

虚血性脳血管障害の病態 －脳切片を用いたアプローチ－

奈良県立医科大学 脳神経外科 平 松 謙一郎
榎 寿 右

1. はじめに

脳卒中は主要先進国における死因第3位を占めるが、我が国ではその死亡率が急激に低下している。しかし高齢化社会に伴い、死は免れたものの重度後遺症による高度依存性の高齢患者は逆に増加し、これに対する医療・看護の体制は今なお大きな社会問題である。とりわけ脳卒中の半数以上を占める虚血性脳血管障害は特に高齢者に多く、再発悪化の頻度も高いため、その発症・悪化に関して今後も十分な対策を講じる必要がある。

虚血性脳血管障害の病態発生に関しては、近年の分子生物学的研究により多くの重要な知見が得られている¹³⁾。しかし未だに謎は多く、解き明かさねばならない問題は山積みの状態である。本稿においては、まず近年の虚血性神経細胞障害の病態に関する研究の流れをまとめ、その中に存在する疑問点を挙げる。次に、当教室において行われている *in vitro* の実験法の手技、特徴を述べ、これにより何が明らかにされ、何が明らかにされうるかを述べたい。

2. 虚血性神経細胞障害の病態研究の流れ

神経細胞が虚血に陥るとその機能は停止し、やがて細胞死に至る。虚血性障害の主役は低酸素であり、ミトコンドリアにおいて酸化的燐酸化が停止し、ATP が枯渇する。この energy failureこそが、神経細胞を死に至らしめる原因であると信じられてきていた。しかし、同じ程度の低酸素侵襲で死ぬ細胞もあれば、死なずに生き延びる細胞もあることや、細胞が死なない程度の軽い低酸素状態であってもそれが長時間続くことによりやはり不可逆的障害が出現することや、あるいは当然細胞が死ぬ

べき程の強い低酸素状態でも種々の保護処置を施すことによりそれを助け得ることなどが知られるようになった。すると、虚血(低酸素)による神経細胞死(細胞死)は単に energy failure というだけでは片付けられない、もっと複雑な機構が働いているのではないかという素朴な、あるいは根本的な疑問が湧いてきたのも当然の結果である。かなり以前より、肝細胞などでの研究で低酸素侵襲による細胞死に細胞内カルシウム流入が重要であると指摘されていた。そこで神経細胞でも同様にカルシウム流入が起こって、それが細胞死に結び付いているのではないかと仮説が立てられた。そして、低酸素が脳皮質の細胞外カルシウム濃度を低下させたという⁹⁾、あるいは低酸素性神経細胞障害が高度にカルシウム濃度依存性であったという⁹⁾ような多くの実験事実により、低酸素による神経細胞障害の機構として細胞内カルシウム流入が一つの大きな機序として認められるに至った。これがいわゆる calcium over load theory である。

それならば次に、どこからどの様にしてカルシウムが流入するのか、またカルシウムが流入してどの様に神経細胞が死ぬのかという新たな二つの疑問が提起される。カルシウムが細胞にとって極めて重要であるのはそれが細胞内 second messenger であることに由縁する。いずれのイオンにおいても細胞内外でそのイオン濃度差は保たれているが、ことカルシウムにおいては実に一万倍の差で細胞内には低い濃度に制限されている。従って微量のカルシウムイオンの流入であっても、その生物学的反応は顕著で、様々な酵素反応が惹起される。これらの特徴ゆえ、カルシウムは second messenger として働き得るのである。この目的のため、細胞内カルシウムは細胞膜内に存在するカルシウムチャンネルによって厳密に管

理されることになる。カルシウムチャンネルは膜の脱分極によりその門戸開放が起こる電位依存性チャンネル(voltage operated channel, VOC)と伝達物質が膜受容体に結合することにより開放が起こる受容体作動性チャンネル(receptor operated channel, ROC)とがある。

この二つのチャンネルの微妙な調節によって second messenger としてのカルシウム細胞内濃度が決定される。従って、前述の疑問点の一つ、即ちどこからカルシウムが流入するののかの疑問に対して、当然この二つのチャンネルが候補となるわけで、それぞれを研究対象とした動物実験および臨床試験が展開された。まず VOC に対しては、いわゆるカルシウム拮抗剤がこのチャンネル機能を阻害するので、それを活かし、実に多種多様のカルシウム拮抗剤を用いた研究が膨大な量で報告された。その結果を簡単にまとめるならば、動物実験レベルではかなり有効だが、臨床データ上では期待したほどではなかった、というものである。

ROC に関しては、グルタミン酸受容体の一つである NMDA receptor に注目が集中した。これは、1) グルタミン酸が中枢神経に豊富に存在する興奮性神経伝達物質であること、2) グルタミン酸の過剰放出が神経細胞を障害すること、3) 低酸素性神経細胞障害の進行動態に神経伝達という過程が必須であること¹¹⁾、4) 虚血中に細胞外グルタミン酸濃度が上昇すること¹⁾、5) グルタミン酸受容体には AMPA 型と NMDA 型があり、NMDA 型の受容体こそが ROC であること、の事実に基づいている。すなわち、低酸素負荷が加わると軸索末端からグルタミン酸が過剰に放出され、これが NMDA 型受容体を興奮させ、その結果カルシウムが細胞内に流入し、神経細胞を障害するという、極めて整然と理論立った病態進行が想定される。よって NMDA 型受容体の遮断薬が大いに期待されるに至った訳で、この舞台でも多くの実験研究がなされた。その結果は概ね良好で、特に非競合型阻害剤である MK-801 は虚血・低酸素侵襲に対する優れた脳保護効果を示し次世代脳保護剤の中心となろうと脚光を浴びた。しかし、MK-801 の脳保護効果の機序はその NMDA 受容体阻害作用ではなく、脳温度低下作用にあるという衝撃的な反論論文が出され²⁾、その後もこれを支持する報告も続いた。それならばと、その後、グルタミン酸のもう一方の受容体である AMPA 型受容体に興味が移り、AMPA 受容体特異性の高い NBQX の開発とともに、この薬剤が前脳虚血に有効であると報告された¹²⁾。本来この

AMPA 受容体はカルシウムを通さないチャンネルではあるが³⁾、ある条件下ではカルシウムを通す可能性も提唱されている^{7,8)}。虚血、低酸素負荷後に神経細胞内にカルシウムが流入する経路として、これら VOC, NMDA channel, AMPA channel、更には、膜障害による非特異的チャンネル(non-specific calcium channel)¹³⁾も加え、未だ結論は得られずして、現在も研究対象となっている。

次に、カルシウムが流入した後、何が起こって細胞は死に至らしめるののかの疑問を考えなければならない。前述のごとく、カルシウムは細胞内 second messenger の一つであり、その細胞内濃度は厳重に管理されている。従って、カルシウムの細胞内濃度が異常に上昇した際には、そのカルシウムにより message され、賦活化される多種の酵素が異常活性化され、細胞障害に関与するものと想定される。蛋白代謝に関与する proteinase、核酸における nuclease、磷脂質における phospholipase など重要な酵素はいずれもが直接カルシウムを、あるいは calcium-calmodulin 系を介して賦活化されるので、細胞障害酵素として候補視される。また最近では、一酸化窒素が脚光を浴びており、これは虚血に対する保護性、攻撃性の両面が指摘され「ジキルとハイド」などと言われているが¹⁰⁾、ラジカル型の一酸化窒素は間違いなく細胞障害性格を有している。この一酸化窒素を合成する酵素、一酸化窒素合成酵素(NOS, nitric oxide synthase)もカルシウム依存性であり、カルシウム流入後の細胞障害要素として現在最も注目されている候補となっている。

以上、虚血性神経細胞障害の病態研究の流れを簡単に述べたが、それらをまとめると Fig. 1 のごとくとなる。即ち、神経細胞に虚血ないし低酸素侵襲が加わると、細胞内カルシウム流入が起こり、それが細胞死に至るのであるが、その間に二つの Black box が存在する。最初の Black box はカルシウムの流入経路であり、後の方はカルシウム流入後の反応形式である。もちろんこれ以外にも解き明かすべき問題もあり、さらにカルシウム非関連機序も存在するはずであり、図の Black box が明らかにされたとしても、病態の解明の一步に過ぎないであろう。しかし、グルタミン酸-カルシウム流入説が虚血性神経細胞障害の病態の大きな軸をなすのもほぼ間違いのない事実である以上、この Black box の解明が当面の課題であり、現実には昨今の研究報告もこれらの点に注目が置かれているものが多い。

3. 脳切片モデルの特徴と実際

1) その位置付けおよび特徴

虚血性神経細胞障害の実験的研究の基盤となるのは言うまでもなく、再現性の高い、有用なモデルの開発である。Table 1 に現在、多くの研究に利用されているモデルを示す。In vivo 系実験は動物成体をそのまま対象とするわけで、それ故に多くの生理学的因子が関与するため、一つの反応系の結果を純粋に評価することが困難となる。逆に in vitro 系実験では、成体の一部を採取し研究対象とするため、その反応系の純粋な結果評価が可能となる。しかし、これから得られた結果がそのまま成体でも当てはまるか否かに関しては定かではない。従って、in vitro 系で得られた結果が in vivo 系でも起こることを証明することや、in vivo 系で出た結果の基礎となつたと考えられる反応系を in vitro 系で確認することなどで、その研究が確かなものであつたことを証明することができる。脳切片モデルは脳の一部を切片化し、適温、酸素、水分を与えることで生理的状态に近い環境に置き、電気生理学的反応をみる方法である。従って、in vitro 系の実験方法であり、上記の利点、欠点がある。すなわち、利点として以下の点を挙げることができる。1) 生理的状态に近い環境を保ちうる。2) 近年虚血脳において重要視されている温度変化を自在に一定化あるいは変化させることができる。3) 血流がないので、脳血流量の変化を考慮に入れなくて済む。4) 薬剤を投与する際は灌流する人工髄液中に混入するので、直接神経細胞に与えることになり、血液脳関門の通過性が問題とならない。欠点はこれら利点の全く裏返しであり、端的にまとめれば、この実験法で得られた結果が種々の要素が絡み合った成体においても、再現しうるかの保証は無いということである。

2) その実際

動物としては、当教室で砂ネズミを用いているが、ラット、モルモットなどもよく使用されている。軽いエーテル麻酔下に断頭し、脳を取りだし、冷却した人工髄液中で目的に応じた部位を採取する。多くは海馬が利用されるが、大脳皮質や、線条体や青斑なども使用できる。これをビブラトームや、チョツパーなどで500 μm 位の厚さに薄切する。35~36°Cに保温したチャンバー内で液層に人工髄液を灌流させ、気層に95%酸素+5%二酸化

炭素を充満させた環境で、網状支持膜上にこの切片を載せ生理的状态を維持させる。その後約1時間安定化するのを待って、実験を開始する。Bipolar の刺激電極を節前線維に置き(海馬切片の場合は Scheffer collateral、大脳皮質の場合は第5層)、微小ガラス管の記録電極を節後線維に置く(海馬切片の場合は CA1 sector、大脳皮質の場合は第3層)。15秒程度の間隔で刺激を繰り返し、その都度記録電極より得られる興奮性シナプス後電位(excitatory post synaptic potential, EPSP)を増幅器を介した上、オシロスコープおよびコンピュータに出力し記録する。必要に応じて、更にもう一本の微小ガラス電極を記録電極近傍におき、直流電位モニター(DC monitor)を行う。以上のシステムおよび典型的波形を Fig. 2, 3 に示す。反応が安定したところで、気層を95%窒素+5%二酸化炭素に変えることにより低酸素負荷をかける。低酸素に進行に伴い、誘発電位振幅は低下し、数分後には平坦となる。この誘発電位の消失に同期して DC monitor 上では、低酸素性脱分極(hypoxic depolarization, HD もしくは DC shift)が観察される。この時点で直ちに再酸素供給を開始すると、誘発電位は徐々に回復しほぼ元のレベルにまで復帰する(Fig. 4)。しかし、一旦 HD 発現した後も一定時間低酸素状態を維持すると、誘発電位はもはや再出現しない(Fig. 5)。この場合は、神経細胞が既に不可逆的に変化に及んだものと考えられることができる。

3) 結果の評価

脳組織に低酸素負荷を加えるとある時点で誘発電位の喪失と、DC monitor 上の HD がほぼ同期して見られる。この時点が細胞外液中のカルシウムが細胞内へ大量流入する時点である^{4,10}。従って、低酸素負荷からこの HD までの時間を測定することにより(Delay to HD)、細胞内カルシウム流入時期の評価を行うことができる。前述の通り、HD 後も一定時間低酸素状態を持続させると、その後再酸素供給を行っても、もはや誘発電位は復元できない。これは、カルシウム流入後の細胞内生物学的反応が進行し、不可逆的な退行変性に陥つたものと考えられる。従って、ある種の処置を施すことによってこの退行変性が抑えられ、誘発電位の再現が見られるならば、この処置がカルシウム流入後の細胞内反応を抑制したものと推定できる。

4. 実験結果

以下の実験はすべて、砂ネズミ大脳皮質切片を用いた実験系で行われた。

1) 低温保護効果⁵⁾

In vitro 系の実験の有利な点を活かし、チャンバー内の温度を変化させ一定化することにより、切片の温度を自在に決定することができる。

1] Delay to HD (Hypoxic Depolarization)

Fig. 6 に結果を示す。この図からわかるように、低温度になる程カルシウムの細胞内流入は遅延する。

2] 低酸素長時間負荷後の誘発電位回復

本実験においては、HD 後更に 20 分間の低酸素を続け、その後酸素の供給を 60 分間行なった。最終の誘発電位の電圧を低酸素負荷前の値で除し、百分率で表して % Recovery とした。結果を Fig. 7 に示す。低温度に保つことにより有意に回復率は改善したが、温度を下げるほど回復率が良くなるという傾向は見られなかった。

虚血脳に体する低温度の保護効果は以前よりよく知られていたが、その機序に関しては不明な点が多い。以上の結果をまとめると、低温度はカルシウム流入以前、以後の両方の過程において働き、特にカルシウム流入の遅延化は温度依存性に働いている。

2) 各種脳保護剤の検定

多種の脳保護剤の効果比較を行う場合、同一の環境下で比較ができて、更に各薬剤の持つ全身状態への影響を無視し得るので、本実験系が有利となる。ここでは以下の脳保護剤を使用した。

NMDA 受容体遮断薬 APV, 2-amino-5-phosphonovaleate,
50 μ M

AMPA 受容体遮断薬 DNQX, 6, 7-dinitroquinoxaline-2,
3-dione, 5 μ M

Calpain 阻害薬 Cl Cbz-Val-Phe-H, 100 μ M

一酸化窒素合成酵素阻害薬 NNLA, N-nitro-L-arginine,
1 mM

1] Delay to HD (Hypoxic Depolarization)

Fig. 8 に結果を示す。いずれの薬剤もカルシウム流入には影響を及ぼさなかった。

2] 低酸素長時間負荷後の誘発電位回復

本実験においては、15 分間の低酸素を負荷した。前述の低温度実験と同様に % Recovery を求めた。Fig. 9 に結果を示す。この図から明らかなように、いずれの薬剤も誘発電位の回復を改善させた。薬剤相互間の比較では、Calpain 阻害薬が最も有効であった。詳しい考察は他誌に譲るが⁶⁾、Calpain はカルシウム依存性の酵素で、細胞の基本構造を保つための骨格蛋白を分解する酵素である。従って、この酵素の過剰活性化にて細胞構造の破壊に結び付くことが容易に想像される。最近特に注目されている一酸化窒素合成酵素阻害剤に関しては、予想に反してそれほど大きな効果は得られず、少なくとも本実験系においては他の薬剤に劣る結果となった。

5. まとめ

In vitro 系の実験の宿命として、これで得られた結果が果して in vivo 系でも再現し得るかの保証は無いし、更には、直接臨床へ応用する可能性は低いものと言わざるを得ない。しかし、組織環境を自在に調節できるということ、カルシウム流入以前と以後という二つの時相で反応を分析できるということの調書は大きく、少なくとも脳保護剤(処置)の一次スクリーニングとしては極めて有用のものと思われる。また、評価するパラメーターの主体は誘発電位、即ち“シナプス機能”であり、虚血ないし低酸素に陥った神経組織の機能をいかに救いうるかという、本来あるべき姿の脳保護を研究する手段であることを最後に強調したい。

Table 1 Experimental Model of Ischemia in Neuronal Tissue

In vitro system

culture of neuronal tissue
brain slice model

In vivo system

forebrain ischemia

Kirino model (gerbil, 5 minutes occlusion of bilateral carotid arteries)
Pulsinelli model (rat, transient bilateral carotid occlusion with vertebral arteries occlusion)
Smith model (rat, transient bilateral carotid occlusion with systemic hypotension)

focal ischemia

Tamura model (rat, middle cerebral artery occlusion)

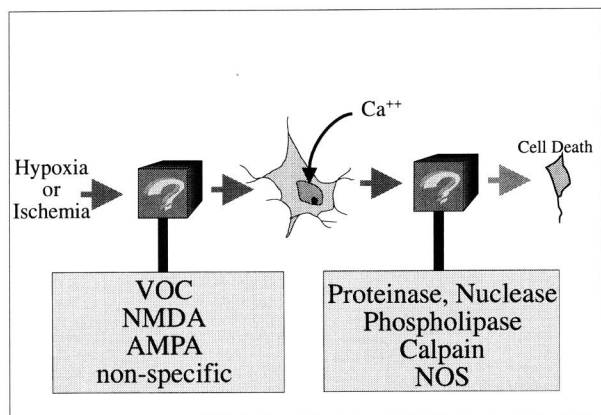


Figure 1

Schematic presentation of the sequence of pathophysiology in ischemic neuronal damage.
Candidates in two black boxes are listed.

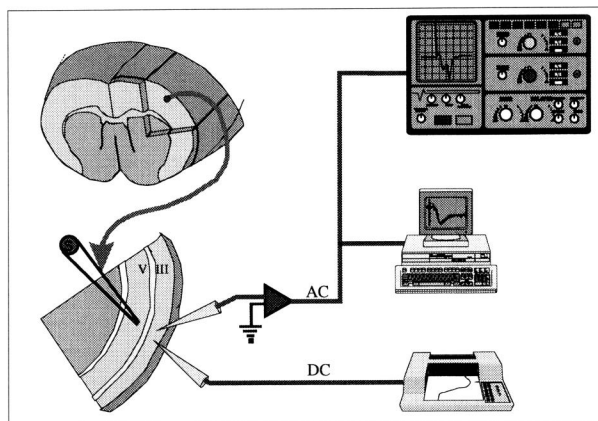


Figure 2

Schematic drawing of the experimental system.

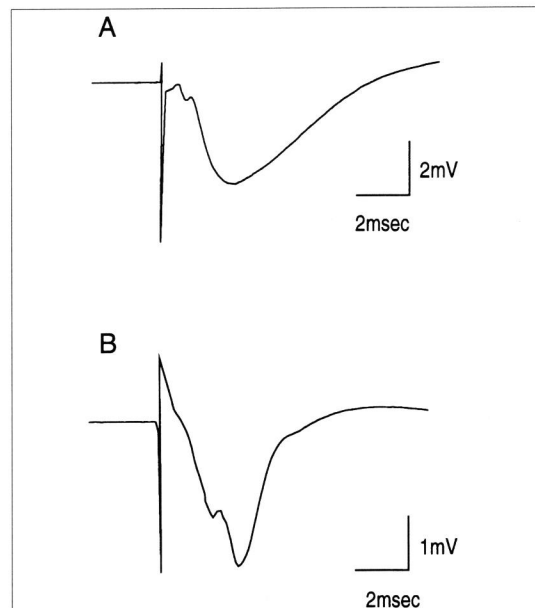


Figure 3

Typical EPSP wave forms of hippocampus (A) and neocortex (B).

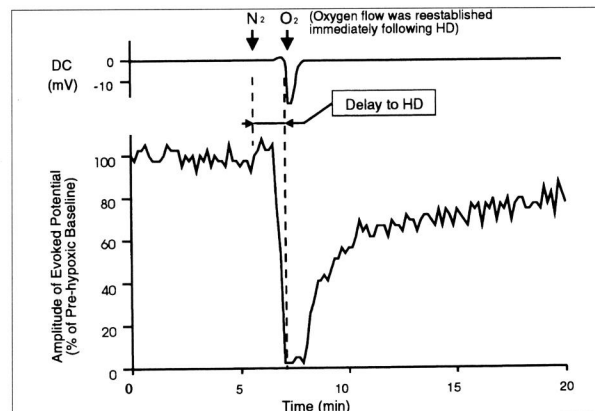


Figure 4

Sequential changes of DC monitoring and the amplitude of evoked potential in neocortical slice. Hypoxia is induced by the replacement of O₂ with N₂. Evoked potential recovers immediately after the reestablishment of oxygen flow.

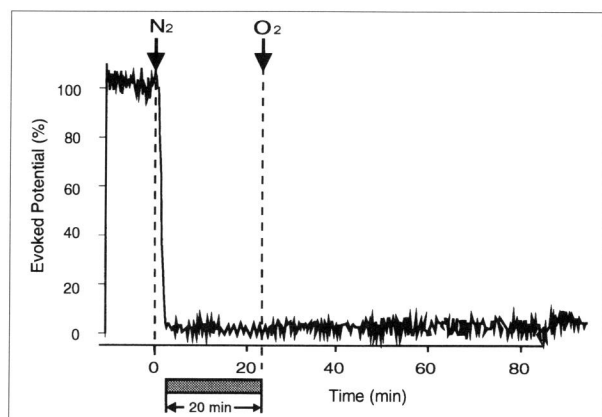


Figure 5

Sequential changes of the amplitude of evoked potential in neocortical slice. Hypoxia is maintained in substantial period. Instead of the reestablishment of oxygen flow, evoked potential does not recover.

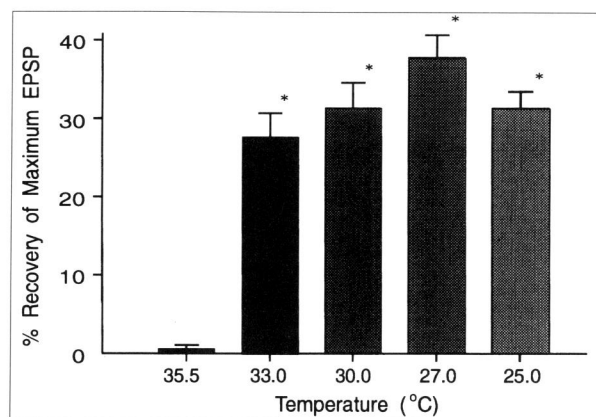


Figure 7

Hypothermia enhances the posthypoxic recovery of synaptic responses. The percentage recovery of the evoked waveform is shown for slices subjected to a fixed (20 minutes) period of hypoxic depolarization. Values are means SD. * $p < 0.001$ vs. 35.5°C (one way analysis of variance followed by Scheffers procedure).

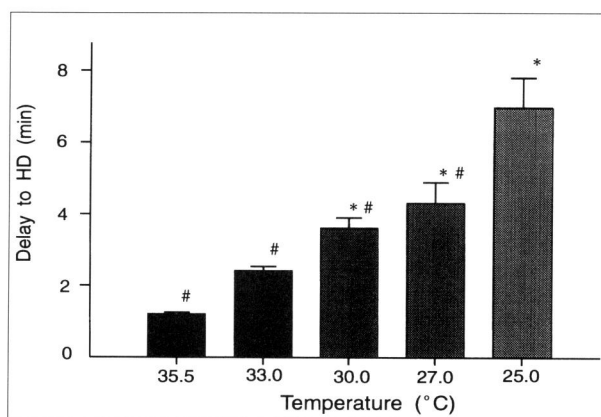


Figure 6

Hypothermia prolongs the delay to hypoxic depolarization (HD). The delays to hypoxic depolarization are shown at different temperatures. Values are mean SD. * $p < 0.01$ vs. 35.5°C ; # $p < 0.01$ vs. 25.0°C (one way analysis of variance followed by Scheffers procedure).

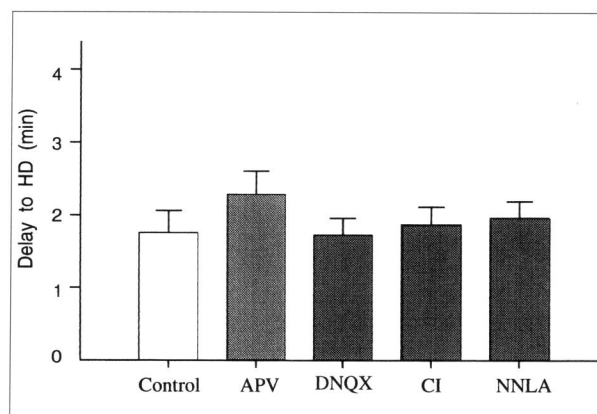


Figure 8

None of the various protective agents prolong the delay to hypoxic depolarization (HD).

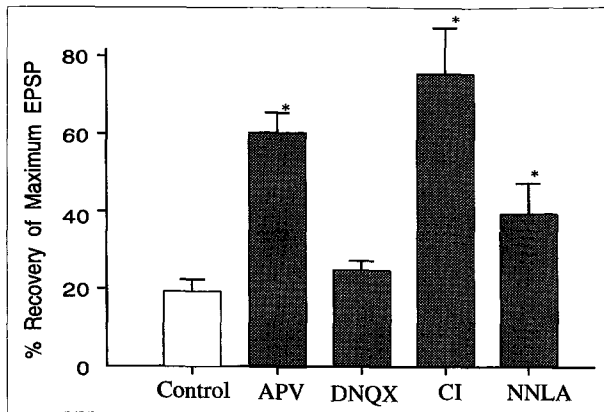


Figure 9

APV (NMDA blocker), CI (calpain inhibitor) and NNLA (NOS inhibitor) enhances the posthypoxic recovery of synaptic responses. The percentage recovery of the evoked waveform is shown for slices subjected to a fixed (20 minutes) period of hypoxic depolarization. Values are means \pm SD. * $p < 0.001$ vs. control (one way analysis of variance followed by Scheffers procedure).

References

- 1) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43 : 1369-1374, 1984
- 2) Buchan A, Pulsinelli W: Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci* 10 : 311-316, 1990
- 3) Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN: Effect of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low Na^+ , low Ca^{2+} solutions. *J Neurosci* 6 : 3144-3151, 1986
- 4) Hansen AJ: Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65 : 101-148, 1985
- 5) Hiramatsu K, Kassell NF, Lee KS: Thermal sensitivity of hypoxic responses in neocortical brain slices. *Society for Neuroscience Abstract* : 1587, 1992
- 6) Hiramatsu K-I, Kassell NF, Lee KS: Improved posthypoxic recovery of synaptic transmission in gerbil neocortical slices treated with a calpain inhibitor. *Stroke* 24 : 1725-1728, 1993
- 7) Hollman M, Hartley M, Heinemann S: Ca^{++} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depend on sub-unit composition. *Science* 252 : 851-853, 1991
- 8) Lino M, Ozawa S, Tsuzuki K: Permeation of calcium through excitatory aminoacid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 424 : 151-165, 1990
- 9) Nicholson C, Bruggencate GT, Steinberg R, Stockle H: Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 1287-1290, 1977
- 10) Pelligrino DA: Saying NO to cerebral ischemia. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 5 : 221-231, 1993
- 11) Rothman SM: Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 220 : 536-537, 1983
- 12) Shardown MJ, Nielsen SO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honor T: 2, 3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (F) quinoxaline: A neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247 : 571-574, 1990
- 13) Siesjö BK, Bengtsson F: Calcium influx, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 9 : 127-140, 1989

- 14) somjen GG, Aitken PG, Balestrino M, Herreras O, Kawasaki K: Spreading depression-like depolarization and selective vulnerability of neurons. A brief review. *Stroke* 21 : 179-183, 1990